

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 10 月 21 日 (21.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/089984 A1

(51) 国際特許分類: C07K 14/705, 16/28, A61K 9/127, 39/395, 51/00, A61P 35/00, C12N 15/09

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/012732

(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 3 日 (03.10.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-291953 2002 年 10 月 4 日 (04.10.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱ウェルファーマ株式会社 (MITSUBISHI PHARMA CORPORATION) [JP/JP]; 〒541-0046 大阪府 大阪市 中央区平野町二丁目 6 番 9 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 平川 容子 (HIRAKAWA, Youko) [JP/JP]; 〒103-8405 東京都 中央区 日本橋本町二丁目 2 番 6 号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京オフィス内 Tokyo (JP). 二木 寿枝 (NIKI, Hisae) [JP/JP]; 〒103-8405 東京都 中央区 日本橋本町二丁目 2 番 6 号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京オフィス内 Tokyo (JP). 大池 進介 (OIKE, Shinsuke) [JP/JP]; 〒103-8405 東京都 中央区 日本橋本町二丁目 2 番 6 号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京オフィス内 Tokyo (JP). 田川 俊明 (TAGAWA, Toshiaki) [JP/JP]; 〒103-8405 東京都 中央区 日本橋本町二丁目 2 番 6 号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京オフィス内 Tokyo (JP). 細川 斎子 (HOSOKAWA, Saiko) [JP/JP]; 〒103-8405 東京

都 中央区日本橋本町二丁目 2 番 6 号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京オフィス内 Tokyo (JP). 芳山 美子 (YOSHIYAMA, Yoshiko) [JP/JP]; 〒227-8502 神奈川県 横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 ソイジーン株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 高柳 昌生 (TAKAYANAGI, Masau); 〒103-8405 東京都 中央区 日本橋本町二丁目 2 番 6 号 三菱ウェルファーマ株式会社 知的財産部 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTIGEN RECOGNIZING ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗体認識抗原

(57) Abstract: An antigen having a part which is exposed on the surface of cells in the course of the formation of a tumor mass in the cells. A medicinal composition containing a ligand which recognizes the above antigen, and a labeling.

(57) 要約: 細胞の腫瘍塊形成時に該細胞表面に露出する部分を含む抗原。さらに、当該抗原を認識するリガンドを含む医薬組成物、及び標識剤。

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/089984 A1

## 明細書

### 抗体認識抗原

#### 技術分野

- 5       本発明は、細胞の腫瘍塊形成時に該細胞表面に露出する部分を含む抗原に関する発明である。より具体的には、固形腫瘍において細胞表面に露出する非筋肉型ミオシン重鎖タイプ A 又はその変異体の一部を、抗原として認識する有用な医薬に関する発明である。

10

#### 背景技術

- 現在、抗癌剤としての高い効果と安全性を得るために、癌細胞に対する抗体を用いた癌ターゲットティング剤の研究が進められている。例えば、胃癌及び大腸癌との反応性からスクリーニングされたヒトモノクローナル抗体が GAH 抗体として知られており（E P 公開第 5 2 6 7 0 0 号及び E P 公開第 5 2 0 4 9 9 号各号公報参照）、該抗体を結合した薬剤封入リポソーム（E P 公開第 5 2 6 7 0 0 号公報参照）の開発が進められている。

20

- 一方、癌化する細胞の種類により、該細胞を認識する抗体の種類も異なることが知られている。抗体が結合した薬剤封入リポソームを癌ターゲットティング剤として利用する場合には、該抗体が認識する抗原を同定することは、抗癌剤としてのより高い効果と安全性を得るために必要であると考えられる。しかしながら、これまでのところ GAH 抗体に関しては該抗体が認識する抗原の同定には至っていなかった。

25

また、これまでに、マウス線維芽細胞株 L929 から精

製したミオシン重鎖をウサギに免疫して得た抗体が、L929その他の細胞表面に反応するという報告があるが（Willingham M.C. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. A. 71, 4144、及び、Olden K. (1976) Cell 8, 383-390参照）、ヒト非筋肉型ミオシン重鎖タイプA（以下「nmMHCA」と略することもある）が癌化によって細胞表面に露出するという報告はなく、さらに該タンパク質が癌関連抗原として報告されている例はない。

- 10 【特許文献1】EP公開第526700号公報  
【特許文献2】EP公開第520499号公報  
【非特許文献1】Willingham M.C. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. A. 71, 4144  
【非特許文献2】Olden K. (1976) Cell 8, 383-390

15

#### 発明の開示

本発明者は上記の課題を解決すべく鋭意検討を重ねてきた結果、EP公開第520499号公報で開示されているヒトモノクローナル抗体（GAH抗体）に代表されるような抗体が、細胞の腫瘍塊形成時に該細胞表面に露出する部分を含む抗原を認識することを見出した。

20

すなわち、本発明の要旨は以下の通りである。

（1）細胞の腫瘍塊形成時に該細胞表面に露出する部分を含む抗原。

25

（2）腫瘍塊が、培養癌細胞の皮下移植により形成した固形腫瘍である前記の抗原。

（3）固形腫瘍において、該固形腫瘍の培養細胞と比較してその存在量が増加している前記の抗原。

（4）固形腫瘍において、該固形腫瘍の培養細胞と比較して、

その細胞表面の存在量が増加している前記の抗原。

(5) 細胞骨格タンパク質又はその変異体である前記の抗原。

(6) ミオシン又はその変異体である前記の抗原。

5 (7) 非筋肉型ミオシン重鎖タイプ A 又はその変異体であることを特徴とする前記の抗原。

(8) 非筋肉型ミオシン重鎖タイプ A 又はその変異体の一部であることを特徴とする前記の抗原。

10 (9) 非筋肉型ミオシン重鎖タイプ A 又はその変異体のタンパク質配列の C 末端側配列であることを特徴とする前記の抗原。

(10) タンパク質配列の C 末端側配列が配列表の配列番号 17 の N 末端側から、600 残基以降 1960 残基までの配列である前記の抗原。

15 (11) タンパク質配列の C 末端側配列が配列表の配列番号 20、21 又は 22 のいずれかである前記の抗原。

(12) 前記の抗原を認識するリガンド。

(13) 抗体であることを特徴とする前記のリガンド。

(14) モノクローナル抗体であることを特徴とする前記のリガンド。

20 (15) モノクローナル抗体が、ヒトモノクローナル抗体であることを特徴とする前記のリガンド。

(16) 癌反応性のモノクローナル抗体であることを特徴とする前記のリガンド。

25 (17) 癌が、胃癌、乳癌、大腸癌又は食道癌であることを特徴とする前記のリガンド。

(18) 重鎖の超可変領域に、配列表の配列番号 1、2 及び 3 のアミノ酸配列を含み、軽鎖の超可変領域に、配列表の配列番号 4、5 及び 6 のアミノ酸配列を含むことを特徴とする前記のリガンド。

(19) 配列表の配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列表の配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含むことを特徴とする前記のリガンド。

(20) 前記のリガンドを含有することを特徴とする医薬組成物。

(21) ターゲッティング療法剤であることを特徴とする前記の医薬組成物。

(22) 癌組織又は癌細胞をターゲットとすることを特徴とする前記の医薬組成物。

10 (23) 抗癌剤、抗腫瘍性タンパク質、酵素、遺伝子又は治療用アイソトープを含有することを特徴とする前記の医薬組成物。

(24) 抗癌剤であることを特徴とする前記の医薬組成物。

15 (25) 癌が、胃癌、乳癌、大腸癌又は食道癌であることを特徴とする前記の医薬組成物。

(26) リポソームを含有することを特徴とする前記の医薬組成物。

(27) 前記のリガンドを含有する標識剤。

20 (28) 癌組織又は癌細胞を特異的に標識することを特徴とする前記の標識剤。

(29) 癌が、胃癌、乳癌、大腸癌又は食道癌であることを特徴とする前記の標識剤。

(30) 蛍光剤、酵素、アイソトープ又はMRI造影剤を含有することを特徴とする前記の標識剤。

25 (31) 前記の抗原を発現している癌疾患患者に、当該疾患の治療の為に前記の医薬組成物を投与する方法。

(32) 前記の標識剤により標識される細胞を有する癌疾患患者に、当該疾患の治療の為に前記の医薬組成物を投与する方法。

(33) 前記の抗原を認識するリガンドの当該抗原への結合活性が、 $0.5 \times 10^6$  単位/mg から  $2.0 \times 10^6$  単位/mg であることを特徴とする前記のリガンド。

5 (34) 結合活性が、 $0.7 \times 10^6$  単位/mg から  $1.5 \times 10^6$  単位/mg、 $0.7 \times 10^6$  単位/mg から  $1.3 \times 10^6$  単位/mg 又は  $0.8 \times 10^6$  単位/mg から  $1.2 \times 10^6$  単位/mg であることを特徴とする前記のリガンド。

(35) 結合活性が、 $0.8 \times 10^6$  単位/mg から  $1.2 \times 10^6$  単位/mg であることを特徴とする前記のリガンド。

10

#### 図面の簡単な説明

第1図は、MKN45の培養細胞及び移植由来細胞に対するGAH抗体の反応性を示す図である。

15 第2図の写真は、nmMHCA安定発現組織切片におけるGAH及び抗nmMHCA抗体の反応性の検討結果を示す図である。

第3図は、nmMHCA安定発現株を用いたGAHの細胞表面反応性の検討結果であり、GAH抗体結合数を示す図である。

20 第4図は、nmMHCA安定発現株を用いた抗nmMHCA抗体の細胞表面反応性の検討結果であり、抗nmMHCA抗体結合数を示す図である。

第5図は、抗nmMHCAペプチド抗体のMKN45培養細胞、MKN45の皮下移植により形成した腫瘍細胞表面に対する反応性の検討結果を示す図である。

25 第6図は、腫瘍増殖抑制効果と細胞あたりの抗原量との関係を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の細胞としては、胃、大腸、食道、乳腺、肺、

脾臓、肝臓、腎臓、卵巣又は子宮由来の細胞が挙げられる。好ましくは胃、大腸、食道又は乳腺由来の細胞が挙げられる。より好ましくは大腸由来の細胞が挙げられる。

- 5       本発明の腫瘍塊とは、可視的、微視的に腫瘍細胞の集合体を形成するものであればいかなるものでもよい。好ましくは、正常組織が自然発生的に固形癌化したもの、癌細胞の移植により該細胞が増殖したものが挙げられる。より好ましくは培養癌細胞の皮下移植により形成した固形腫瘍が挙げられる。
- 10

- 本発明の露出とは、内部にある物質が細胞膜の表面に現れること、あるいは表面を覆っている物質が剥がれることで内部にある物質が露呈することをいい、好ましくは、抗原の一部が細胞の表面に現れることをいう。さらに好ましくは、抗原のタンパク質配列のC末端側が細胞の表面に現れることをいう。
- 15

- 本発明の抗原としては、正常細胞においては細胞骨格や細胞内小器官として機能していると考えられるタンパク質、糖タンパク質、タンパク質脂質複合体又はこれらの変異体が挙げられる。好ましくは、細胞が腫瘍塊を形成することにより抗原として機能するものが挙げられる。さらに好ましくはミオシン、アクチン、トロポミオシン、ビメンチン、サイトケラチン等又はこれらの変異体が挙げられる。最も好ましくはヒト非筋肉型ミオシン重鎖タイプA (nmMHCA) が挙げられる。ここで、nmMHCAは、Toothaker LEらの方法[Blood, vol. 78 (7), pp. 1826-1833, 1991]や、Saez CGらの方法[Proc Natl Acad Sci U S A 1990 Feb;87 (3):1164-8]に従って遺伝子を取得し、該遺伝子を用
- 20
- 25

いて、Molecular Cloning, A Laboratory Manual( Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に従いタンパク質を発現させることにより得られる。

5       本発明のタンパク質のC末端側配列としては、例えば、配列表の配列番号17に示すnmMHCAのN末端側から600残基以降1960残基までの配列が挙げられ、好ましくは配列表の配列番号20、21又は22の配列が挙げられる。

10       本発明の固形腫瘍と該固形腫瘍の培養細胞との比較は、例えば、培養癌細胞と、当該培養細胞を一旦動物に移植して形成される固型腫瘍から分離される固型腫瘍由来の癌細胞を比較する方法や、患者の固型癌組織から分離した癌細胞と、当該癌細胞を一旦インビ  
15       トロで培養し馴化した培養癌細胞とを比較する方法等が挙げられるが、これらに限定されない。

      本発明の細胞表面の存在量とは、細胞全体における抗原の存在量又は細胞表面のみにおける抗原の存在量を示すが、好ましくは細胞表面のみにおける抗原の  
20       存在量を示す。細胞表面の存在量は、例えばフローサイトメトリーによって定量することが可能であるがこれに限定されない。

      本発明の増加とは、3倍以上増加することが挙げられるが、好ましくは4倍以上、より好ましくは10倍  
25       以上増加することが挙げられる。

      本発明の変異体とは、1又は数個のアミノ酸を欠失、置換又は付加したアミノ酸配列を有するもの、又は正常のタンパク質の立体的構造が変化したものが挙げられる。



本発明のリガンドとは、各種抗体、線維芽細胞成長因子（FGF）、上皮細胞成長因子（EGF）等の成長因子又は増殖因子等のタンパク質が挙げられるが、好ましくは抗体が挙げられる。また、抗体としては各種動物のポリクローナル抗体、マウスモノクローナル抗体、ヒトーマウスキメラ抗体又はヒト型モノクローナル抗体及びヒトモノクローナル抗体が挙げられるが、好ましくはヒトモノクローナル抗体が挙げられる。さらに好ましくは癌反応性のヒトモノクローナル抗体が挙げられ、好ましくはEP公開第520499号公報で開示されているヒトモノクローナル抗体（GAH抗体）が挙げられる。

GAH抗体において、配列表の配列番号1、2及び3のアミノ酸配列は、重鎖可変領域の中でも超可変領域と呼ばれ、同様に配列表の配列番号4、5及び6のアミノ酸配列は、軽鎖可変領域の中でも超可変領域と呼ばれる。かかる領域は、免疫グロブリンの抗体としての特異性、抗原決定基と抗体の結合親和性を決定するものであり、相補性決定部とも呼ばれる。従って、かかる超可変領域以外の領域は他の抗体由来であっても構わない。すなわち、GAH抗体と同様の超可変領域を有する抗体はGAH抗体と同様に本発明において使用できると考えられる。

従って、本発明に使用される好ましいモノクローナル抗体としては、重鎖の超可変領域に、配列表の配列番号1、2及び3のアミノ酸配列を含み、軽鎖の超可変領域に、配列表の配列番号4、5及び6のアミノ酸配列を含むものである。これらのアミノ酸配列は、通常、重鎖及び軽鎖の各鎖の3つの超可変領域に、N末

端側から、配列表の配列番号 1、2 及び 3 並びに配列表の配列番号 4、5 及び 6 の順でそれぞれ含まれる。本発明においては、癌との反応性を損なわない範囲で一部のアミノ酸を置換、挿入、削除あるいは追加する等の改変を行ったものも、本発明において使用できるモノクローナル抗体に含まれる。

本発明のモノクローナル抗体は、癌患者由来リンパ球とマウスミエローマ細胞とのハイブリドーマを作製し、上記の特定のアミノ酸配列を有するものを選択することによって得ることができる。

ハイブリドーマは、A. I m a m らの方法 [ C a n c e r R e s a r c h 4 5 , 2 6 3 ( 1 9 8 5 ) ] に準じて、まず、癌患者から摘出された癌所属のリンパ節から、リンパ球を単離し、ポリエチレングリコールを用いてマウスミエローマ細胞と融合して得られる。得られたハイブリドーマの上清を用いて、パラフォルムアルデヒド固定した各種癌細胞株に対し、エンザイムイムノアッセイにより陽性を示す抗体を産生するハイブリドーマを選択し、クローニングを行う。

さらに、ハイブリドーマの上清から、常法 [ R . C . D u h a m e l ら、J . I m m u n o l . M e t h o d s 3 1 , 2 1 1 ( 1 9 7 9 ) ] によりモノクローナル抗体を精製し、蛍光物質でラベルし、生癌細胞株、各種の赤血球、白血球等に対する反応性をフローサイトメトリーで検出することにより、生癌細胞株に対しては反応性を示す抗体を、赤血球、白血球に対しては、反応性を示さない抗体を選別する。また、癌患者から摘出される癌組織から単離される癌細胞、及び同一患者の同一組織の非癌部から単離される正常細胞に対

する反応性を比較して、癌細胞に、より多量の抗体が結合し、正常細胞には反応がないか、もしくは健康人由来の抗体と同程度の反応性しかない抗体を選別する。

- 5       かくして選別されたハイブリドーマが産生する抗体をコードするDNAの塩基配列は、たとえば、以下の方法によって得られる。抗体産生ハイブリドーマから、チオシアン酸グアニジン-塩化リチウム法 [Casaraら, DNA, 2, 329 (1983)] でmRNAを調製して、  
10       オリゴ(dT)プライマーを用いてそのcDNAライブラリーを作製する。次いで、cDNAに(dG)テ-リングを行い、このdGテールにハイブリダイズするポリCと、既に遺伝子が取得されているヒト抗体重鎖遺伝子、軽鎖遺伝子の各々共通な配列部分をプローブとしてPCR法によって、抗体をコードするcDNAを増幅させる。その後、DNAの末端平滑化を行い、  
15       電気泳動法によってゲルから切りだしたDNAをpUC119等のクローニングベクターに挿入し、Sangerらのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463 (1977)] によってその塩基配列が  
20       決定される。この塩基配列に基づいて、上記特定のアミノ酸配列を有するものを選別できる。

- 25       また、本発明において使用されるモノクローナル抗体は、遺伝子工学的な手法により作製することもできる。

本発明において特に好適なモノクローナル抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域が夫々配列表の配列番号7及び8のアミノ酸配列で表されるものである。重鎖及び軽鎖の定常領域の塩基配列は、例えばNuc

leucic Acids Research 14, 17  
79 (1986)、The Journal of B  
i o l o g i c a l C h e m i s t r y 257, 1  
516 (1982) 及び Cell 22, 197 (1  
5 980) に記載のものと同一配列を有するものでよい。

本抗体は、本抗体を産生するハイブリドーマを牛胎  
児血清含有 e R D F、R P M I 1640 培養液等を用いて培養するか、又は、上記の特定の超可変領域を含む可変領域をコードする D N A にさらに重鎖及び  
10 軽鎖の定常領域をコードする D N A が夫々連結された遺伝子を化学合成し、その遺伝子の発現を可能とする公知の種々の発現ベクター、例えば、動物細胞における発現ベクターとして、p K C R H 2 [三品ら、Na  
15 ture, 307, 605 (1984)] から E P 公開第 52049  
9 号公報の図 1 又は図 2 に示した手順で構築することができる p K C R (Δ E) / H と p K C R D に挿入し、C H O 細胞 (チャイニーズ ハイスター 卵巣細胞) 等の宿主中で発現させることにより得ることができる。例えば、重鎖遺伝子の両端に H i n d I I I 部位を  
20 付加したものを p K C R (Δ E) / H の H i n d I I I 部位に挿入し、またこのプラスミドの S a l I 部位に D H F R 遺伝子等の選択マーカー遺伝子を挿入する。一方、軽鎖遺伝子の両端には E c o R I 部位を付加したものを p K C R D の E c o R I 部位に挿入し、さら  
25 にこのプラスミドの S a l I 部位にも D H F R 遺伝子を挿入する。両プラスミドを C H O d h f r<sup>-</sup> [Ur  
laub G. & Chasin L.A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 4216 (1980)] 等の細胞にリン酸カルシウム法で導入し、ヌクレオチドを含まない α M E M 培

養液等で増殖する細胞から、さらに抗体を産生する細胞を選別することによって得ることができる。抗体は、これらの細胞を培養した培養液から、プロテインAをセルロファイン、アガロース等の支持体に結合させたカラム等に吸着し、溶出させること等によって精製される。

本発明の癌とは、例えば単鎖抗体（scFv）やwhole抗体あるいはそのフラグメントとして抗体を使用する場合、該抗体が反応性を有する可能性のある癌種が挙げられる。好ましくは胃癌、大腸癌、食道癌、肺癌、乳癌、肝癌、卵巣癌、子宮癌又は膀胱癌が挙げられる。さらに好ましくは、胃癌、乳癌、大腸癌又は食道癌が挙げられる。

本発明の医薬組成物としては、リガンド単独、あるいはリガンドに作用性物質を結合したターゲッティング療法剤が挙げられるが、好ましくは、ターゲッティング療法剤が挙げられる。ターゲッティング療法剤は、リガンドに作用性物質が直接結合したもの、リガンドに作用物質が水溶性高分子を介して結合したものの、リガンドに作用性物質を含有した微粒子が結合したものが挙げられる。微粒子としてはマイクロスフェア、ミセル又はリポソームが挙げられるが、好ましくはリポソームが挙げられる。リポソームの中には医薬品や標識剤が封入されていても良い。これらに封入する医薬品としては、アドリアマイシン、ダウノマイシン、ビンブラスチン、シスプラチン、マイトマイシン、ブレオマイシン、アクチノマイシン、フルオロウラシル（5-FU）の抗腫瘍剤又はそれらの薬学的に許容しうる塩及び誘導体が挙げられる。また、リシンAや

ジフテリアトキシシンの毒素タンパク質及びそれをコードするDNA、TNFのサイトカイン遺伝子をコードするDNA又はアンチセンスDNAにヌクレオチド類が挙げられる。特に好ましくはアドリマイシンが挙げられる。また、これらに封入する標識剤としては放射性元素、例えばインジウム、テクネシウムのイメージング薬剤や、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼの酵素、ガドリニウムのMRI造影剤、ヨウソのX線造影剤、CO<sub>2</sub>の超音波造影剤、ユーロピウム誘導体、カルボキシフルオレッセインの蛍光体又はN-メチルアクリジウム誘導体の発光体が挙げられる。水溶性高分子誘導体としては、ポリエチレングリコール、ポリアクリルアミド、ポリビニルピロリドン、ポリグリセリン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸又はポリアミノ酸の合成高分子が挙げられ、好ましくはポリエチレングリコールが挙げられる。該ターゲッティング療法剤は癌組織又は癌細胞をターゲットとすることがより好ましい。この場合の癌としては、胃癌、大腸癌、食道癌、肺癌、乳癌、肝癌、卵巣癌、子宮癌、又は膵癌が挙げられる。好ましくは、胃癌、乳癌、大腸癌又は食道癌が挙げられる。

本発明において、抗原を認識するリガンドの当該抗原への結合活性は、例えば、抗原を認識するリガンドを工業的に用いる場合に、当該リガンドの品質の恒常性を確保するためなどに測定されるが、この目的に限定されない。また、測定方法としては、例えば、一定量の抗体を含む標準溶液からマイクロプレートリーダー等を用いて検量線を作成し、試験溶液に含まれる抗体の抗原に対する結合活性を測定する方法等があるが、この測定方法に限定されない。

結合活性を力価で示す場合には、 $0.5 \times 10^6$  から  $2.0 \times 10^6$  単位 / mg の範囲が挙げられるが、好ましくは、 $0.7 \times 10^6$  から  $1.5 \times 10^6$  単位 / mg、 $0.7 \times 10^6$  から  $1.3 \times 10^6$  単位 / mg 又は  $0.8 \times 10^6$  から  $1.2 \times 10^6$  単位 / mg の範囲が挙げられる。より好ましくは、 $0.8 \times 10^6$  から  $1.2 \times 10^6$  単位 / mg が挙げられる。

リガンドが結合した作用性物質及び水溶性分子誘導体の複合体は、例えば、EP 公開第 5 2 6 7 0 0 号公報又は EP 公開第 5 2 0 4 9 9 号公報に記載の方法により製剤化することができ、該複合体を、癌等の各種疾患の治療のために、血管内投与、膀胱投与、腹腔内投与、局所投与等の方法で患者に投与することができる。投与量は有効成分の抗腫瘍性物質の種類に応じて適宜選択することができるが、例えばドキソルビシンを封入したリポソームを投与する場合には、有効成分量として 50 mg / kg 以下、好ましくは 10 mg / kg 以下、より好ましくは 5 mg / kg 以下で用いることができる。

#### 実施例

以下、本発明を実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り、以下の実施例には限定されない。

実施例 1 抗体の反応性比較及び免疫沈降による細胞表面抗原の検出

#### MKN 45 の皮下移植による腫瘍細胞の調製

ヒト胃癌細胞 MKN 45 (日本免疫生物研究所) を牛胎児血清 (シグマ社) を 10 % 含む液体培地 e R D F (ギブコ社) で培養し、細胞を回収して 5 週齢前後の BALB / C ノードマウス (日本クレア) の背部皮

下に移植した。形成された皮下腫瘍組織を摘出し、時田らの方法〔癌の臨床、32, 1803 (1986)〕に従って組織からの細胞の単離を行った。組織をゴム板の上に敷いたテフロンシートにのせ、カミソリで叩いて細切し、ナイロンメッシュ (FALCON社 セルストレーナー) を通して結合組織を除去した。濾液である細胞懸濁液を1500回転5分間遠心し (トミー卓上遠心機 LC06-S P)、浮遊した脂肪と懸濁した壊死部分を捨て、沈査を繰り返し洗浄した。

10 フローサイトメトリーによるGAH抗体の反応性比較

15 MKN45の培養細胞、あるいはMKN45の皮下移植により形成した固形腫瘍細胞 (以下「腫瘍細胞」という) に、フルオレッセインイソシアネート (FITC: シグマ社) で標識した、EP公開第520499号公報及びEP公開第1174126号公報に記載のGAH抗体を20  $\mu$ g / mlの濃度で4℃1時間反応させ、リン酸緩衝化生理的食塩水 (PBS) で1回洗浄した。プロピジウムアイオダイド (PI: シグマ社) を含むPBS中でフローサイトメータ (FACSscan: ベクトンディッキンソン社) を用いて解析した。PI陽性細胞すなわち死細胞はゲーティング操作により解析の対象から除外した。FITC蛍光強度を表す指標であるFL1の平均チャンネル数を求めて、MKN45の培養細胞と腫瘍細胞の比較を行った。

20

25

結果を第1図に示す。縦軸は平均チャンネル数から、抗体を含まない場合の値をバックグラウンド値 (BG) として差し引いた値を示す。Eは10のべき乗を



示す。

G A H 抗体は、M K N 4 5 の培養細胞に比べて、腫瘍細胞に対して約 1 8 倍という、より強い反応性を示した。

- 5        この結果より、培養細胞と比較して、G A H 抗体は腫瘍細胞に対してより高い反応性を有することが明らかとなった。

#### 細胞の表面のビオチン標識及び可溶化上清の調製

- 10        M K N 4 5 の培養細胞、あるいは腫瘍細胞に、ビオチン試薬 ( s u l f o N H S - b i o t i n : P I E R C E 社 ) 1 m g / m l P B S 溶液を加え、4 ° C で 3 0 分振とうしながらインキュベートした。その後 5 m M グリシン ( ナカライ社 ) を含む P B S 、ついで P B S で洗浄した。細胞のペレットに 1 5 0 m M N a C l 、
- 15        1 m M E D T A を含む 2 0 m M トリス ( シグマ社 ) 、塩酸緩衝液 P H 7 . 5 、 ( T N E バッファー ) に 1 % N P 4 0 、アプロチニン ( シグマ社 ) 、メシル酸ナフアモスタット ( 鳥居薬品社 ) を含む溶液を加えて攪拌、超音波処理し、氷上 1 時間放置後、1 5 0 0 0 r p m 1
- 20        0 分間 ( トミー小型冷却遠心機 M R X - 1 5 0 ) 遠心して、上清を細胞の可溶化上清とした。

#### 免疫沈降及び b i o t i n 標識バンドの検出

- 25        P B S で平衡化したプロテイン A セファロース C L 4 B ( ファルマシア社 ) に G A H 抗体、又は健常人血清由来ヒト免疫グロブリン ( ヒト I g s ) ( スキャンティボディズラボラトリー社から入手したヒト血清からプロテイン A カラム ( レプリジェン社 ) を用いて精製した ) 溶液を加えて抗体を樹脂に結合させたものを P B S で洗浄し、細胞の可溶化上清を添加して

4℃一晩振とうしながらインキュベートした。遠心して上清を除去した後、樹脂を0.1%NP40（ナカライ社）を含むTNEバッファで3回洗浄し、SDSポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）用サンプルバッファで抽出してSDS-PAGE（グラジエントゲル4から12%）を行い、PVDF膜（ミリポア社）にウエスタンブロッティングを行った。タンパク質が転写された膜を、0.1%ゼラチン（ナカライ社）及び0.05%Tween 20（ナカライ社）を含むPBSで室温1時間インキュベートした後、biotin標識タンパク質を検出するためにベクトステインエライトABC（Vectastain Elite ABC：ベクター社）で室温1時間反応させた。発色にはコニカイムノステインHRP1000（コニカ社）を用いた。レーン1に用いたサンプルは腫瘍細胞のGAH抗体による免疫沈降物、レーン2に用いたサンプルは培養細胞のGAH抗体による免疫沈降物、レーン3に用いたサンプルは腫瘍細胞のヒトIgGによる免疫沈降物、レーン4に用いたサンプルは培養細胞のヒトIgGによる免疫沈降物である。

レーン1の腫瘍細胞のGAH抗体による免疫沈降物に対して、GAH抗体に特異的なバンドが分子量約200kdの位置に検出された。レーン2の培養細胞のGAH抗体による免疫沈降物に対しては、相当する位置にバンドはほとんど検出されなかった。

この結果より、GAH抗体は、約200kdのタンパク質に反応性を有することが明らかになった。さらに、この約200kdのタンパク質は、腫瘍細胞表面に露出していることが示された。

200 k d タンパク質のアミノ酸配列解析

免疫沈降で特異的に検出された 200 k d タンパク質をポリアクリルアミドゲルから切り出し、リジルエンドペプチダーゼ（和光純薬社）処理後逆相クロマトグラフィーで得られたピークについてアミノ酸配列解析を行った（配列表の配列番号 9 から 16）。

これらの配列を元にホモロジー検索を行ったところ、ヒト非筋肉型ミオシン A 鎖（nmMHCA）とこの 200 k d のタンパク質は一致した（配列表の配列番号 17）。

この結果より、200 k d のタンパク質は、nmMHCA であることが明らかになった。

抗非筋肉型ミオシン重鎖（nmMHC）抗体による検出

上述の免疫沈降サンプルを SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングを行い、0.1%ゼラチン及び 0.05% Tween 20 を含む PBS で室温 1 時間インキュベートした後、抗 nmMHC ウサギポリクローナル抗体（Biomedical Technologies 社）溶液中で室温 1 時間反応させた。抗体の陰性コントロールとして、ノーマルウサギ免疫グロブリン（ノーマルウサギ IgG：バイオジェネシス社）を用いた。2 次抗体として抗ウサギ IgG のペルオキシダーゼ標識体（カペル社）の溶液中で反応した後、コニカイムノステイン HRP 1000 にて発色させた。レーン 1、2 及び 3 に用いたサンプルは腫瘍細胞の GAH 抗体による免疫沈降物であり、レーン 4、5 及び 6 に用いたサンプルは培養細胞の GAH 抗体による免疫沈降物であった。レーン 1 及び 4 は Vect

a s t a i n E l i t e A B C で検出、レーン 2 及び 5 は抗 n m M H C 抗体で検出、レーン 3 及び 6 はノーマルウサギ I g G で検出したものである。

レーン 1、2 及び 5 でバンドが検出された。

- 5        この結果より、培養細胞及び腫瘍細胞いずれにおいても G A H 抗体により約 2 0 0 k d のタンパク質すなわち n m M H C A が認識され、腫瘍細胞では、n m M H C A が細胞表面に存在することが明らかとなった。

10

実施例 2    n m M H C A 強制発現株を用いた検証

n m M H C A 発現ベクターの作製

- 15        n m M H C A 遺伝子である HA1.0 と HALES (Robert S. Adelstein より提供) を、制限酵素 EcoRI (タカラバイオ社) にて切断した。一方、n m M H C A 遺伝子を組込む側のほ乳類細胞遺伝子発現用プラスミドベクター pEF1/Myc-HisB (インビトロジェン社) も同様に制限酵素 EcoRI 切断を行い、次いで BAP にて脱リン酸化処理を行った。
- 20        n m M H C A 遺伝子断片と、pEF1/Myc-HisB 断片をライゲーションし、トランスフォーメーションして、HA1.0 を組み込んだもの (pEF1B-HA1.0 と名付けた)、HALES を組み込んだもの (pEF1B-HALES と名付けた) を得た。n m M H C A 全長ほ乳類細胞発現用ベクターの調製は、pEF1B-HA1.0 を鋳型として、配列表の配列番号 18 のプライマー
- 25        と配列表の配列番号 19 のプライマーを用い、PCR 反応 (Advantage cDNA PCR kit クロンテック社) を行った。この PCR 産物を KpnI-HA1.0-SpeI と名付けた。一方で、pEF1B-HALES を制限酵素 KpnI と SpeI (いずれもタカラバイオ社) にて切断した。KpnI-HA1.0-SpeI

を pEF1B-HALES 制限酵素切断物に挿入し、次いで大腸菌の形質転換を行った。得られたクローンのプラスミドのマッピングを行って、目的である nmMHCA 全長は乳類細胞発現用ベクターが作製されたことを確認した。

#### 5 COS-7 強制発現細胞株の作製

ほ乳類細胞遺伝子発現用プラスミドベクター pEF1/Myc-HisB (インビトロジェン社) に nmMHCA 遺伝子を組み込み、培養したアフリカミドリザル腎臓由来細胞株 COS-7 細胞 (東北大学加齢研究所医用細胞資源センターより入手) に、ポリフェクト (PolyFect: キアゲン社) を用いたリポフェクション法により遺伝子導入を行った。遺伝子導入した細胞を 37℃、5% CO<sub>2</sub> 存在下にて培養し、48 時間後に一過性発現細胞株として免疫沈降の実験に用いた。安定発現株は、遺伝子導入後、37℃

10 5% CO<sub>2</sub> 存在下にて培養し、ジェネテシン G418 (シグマ社) により安定発現株の薬剤選択を行うことで樹立した。また、nmMHCA 安定発現株を用いた試験を行う際に、遺伝子導入操作、薬剤選択操作による細胞株への影響を考慮するため、ネガティブコントロールとして

15 COS-7 の mock 細胞を作製した。mock 細胞は、nmMHCA 遺伝子を組み込んだ際に使用したプラスミドの、プラスミド部分 (pEF1/myc-HisB) のみを用いて、COS-7 細胞にリポフェクション法により遺伝子導入し、薬剤選択を行うことで作製した。

#### 25 HCT-15 安定発現株の作製

COS-7 と同様な方法で、ヒト大腸癌細胞株 HCT-15 細胞 (東北大学加齢研究所医用細胞資源センターより入手) を用いた nmMHCA 遺伝子導入安定発現株の作製を行った。HCT-15 においても mock 細胞を作製した。

GAH抗体による免疫沈降

COS-7及びHCT-15のnmMHCA一過性発現細胞と非導入細胞の各々をスクレイパーで回収し、0.5mlの可溶化バッファーを加えて超音波処理（出力2、頻度50%）を5秒間行い、細胞を破碎した。氷上1時間放置した後、マイクロチューブ遠心機にて15000rpm 10分遠心分離し可溶化上清を得た。得られた上清に含まれるタンパク質濃度をそろえるため、実施例1と同様にBCAタンパク質解析キット（BCA protein Assay kit：ピアース社）を用いてタンパク質定量を行った。免疫沈降についても実施例1と同様に行い、免疫沈降物及び、比較のため可溶化上清についてSDS-PAGE（ゲル濃度6%）を行い、ウェスタンブロッティングを行った。膜をブロッキングバッファー（0.1%ゼラチン及び0.05% Tween 20を含むPBS、0.05% sodium azide（和光純薬社））中で室温1時間インキュベートし、抗nmMHC抗体をブロッキングバッファーで100倍に希釈して室温1時間反応させた。反応後PBST（0.05% Tween20を含むPBS）で室温5分間ずつ3回洗浄し、抗ウサギIgG-HRP標識抗体をHRP標識体希釈バッファー（0.1%ゼラチンを含むPBS）で1500倍に希釈したものを室温1時間反応させた。反応後PBSTで室温5分間ずつ3回洗浄し、発光基質ECL（アマシャム社）を用いてバンドを検出した。レーン1、2及び3に用いたサンプルはnmMHCA導入細胞で、レーン1は可溶化上清、レーン2はGAH抗体による免疫沈降物、レーン3はヒトIgsによる免疫沈降物である。またレーン4、5及び6に用いたサンプルはmock細胞で、レーン4は可溶化上清、レーン5はGAH抗体による免疫沈降物、レーン6はヒ

ト IgS による免疫沈降物である。

レーン 1 及び 2 において約 200Kd のバンドが確認された。

5 この結果より、nmMHCA 一過性発現株のみにおいて、GAH 抗体特異的に nmMHCA が免疫沈降されることが明らかになった。

#### ウエスタンブロッティング による nmMHCA 安定発現株取得確認

10 COS-7、HCT-15 共に薬剤選択後の安定発現株及び mock を、スクレイパーにより回収し、SDS-PAGE サンプルバッファーを加えて超音波処理を行い、細胞を破碎した。調製したサンプルのタンパク質濃度を BCA protein Assay kit にて定量し、これについて SDS-PAGE (ゲル濃度 6%)、ウエスタンブロット、  
15 及び抗 nmMHC 抗体による検出をおこなった。

COS-7 の mock 細胞では nmMHCA が検出限界以下であるのに対し、nmMHCA 安定導入株 FL11 では nmMHCA 分子量相当の約 200kd のバンドが確認された。また、HCT-15 について  
20 も、mock 細胞では nmMHCA が検出限界以下であるのに対し、nmMHCA 安定発現株 FL1 及び FL2 において nmMHCA が検出され、発現量は FL1 にくらべて高いことが示された。

#### nmMHCA 発現細胞株を用いたヌードマウス移植癌細胞切片の免疫染色

25

HCT-15 の各種 nmMHCA 安定発現株をマトリゲル (ベクトンディッキンソン社) に懸濁し、ヌードマウス背部皮下に  $5 \times 10^6$  cells/spot となるよう 2 箇所ずつ移植した。腫瘍の生着性を確認した後摘出し、一部

を10% ホルマリン-PBS に浸して奈良病理研究所にてパラフィン切片の作製及びヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を行った。

切片はキシレン、エタノールを用いて脱パラフィンし、10mM sodium citrate, pH6.0 buffer に浸してマイクロウェーブを照射し (600W 5分を 3 回)、30分間室温放置して空冷した後 5%(w/v)BSA-PBSA<sub>2</sub> 溶液に 1 時間浸した。ビオチン標識 F(ab')<sub>2</sub> 化 GAH 抗体 66  $\mu$ g/ml、あるいはビオチン標識抗 nmMHC 抗体 100  $\mu$ g/ml と 37°C で 2 時間インキュベートし、続いてストレプトアビジン PerCP (ベクトンディッキンソン社) 溶液 2.5 倍希釈液と氷冷遮光下で 30 分反応させた。反応終了後、オリンパス落射蛍光顕微鏡 BX-50 を用いて各切片の同視野における PerCP の赤色蛍光を観察した。

結果を第 2 図に示す。GAH 抗体は、対照として用いた mock 細胞の組織切片 (Mock) に比べ、nmMHCA 安定発現株の組織切片 (FL1、FL2、FL7) に対して、強い赤色蛍光を示した。さらに、抗 nmMHC 抗体は、nmMHCA 安定発現株の組織切片のみに明確な赤色蛍光が認められた。また、抗 nmMHC 抗体の赤色蛍光像は、GAH 抗体の赤色蛍光像と類似していた。

この結果より、nmMHCA の導入により組織切片での GAH の反応性が上昇することが示された。

#### nmMHCA 安定発現細胞株を用いた GAH 抗体生細胞反応

#### 性

nmMHCA 安定発現株をマトリゲルに懸濁し、ヌードマウス背部皮下に  $5 \times 10^6$  cells/spot となるよう 2 箇所ずつ移植した。腫瘍の生着性を確認した後摘出し、細切して腫瘍細胞を採取した。FITC 標識 GAH 抗体、あ



るいは FITC 標識 ヒトイムノグロブリンをヒト血清  
(スキャンティボディズラボラトリーズ社) で  $33 \mu\text{g}/\text{ml}$   
となるよう希釈した。また FITC 標識抗 nmMHC  
抗体、あるいは FITC 標識ウサギ IgG をヒト血清で  
5  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるよう希釈した。これらの抗体液を各  
腫瘍細胞と良く混和して遮光氷冷下で 1 時間反応さ  
せた。反応終了後 0.1% sodium azide  
を含む PBS にて細胞を洗浄し、ベクトンディッ  
キンソン BD-LSR を用いて以下の通りフローサイ  
10 トメトリー解析を行った。細胞を  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  PI を含む  
FACSflow (フローサイトメーター付属バッファー)  
溶液に懸濁し、実施例 1 と同様に PI 陽性細胞すなわ  
ち死細胞はゲーティング操作により解析の対象から  
除外し、生細胞集団における細胞 1 個当たりの FITC 蛍  
15 光強度の平均値を求めた。同条件下で測定した結合 FI  
TC 分子数既知の標準蛍光ビーズ (フローサイトメトリ  
ースタンダードズ社) の蛍光強度の平均値より検量線  
を作成し、各試料の蛍光強度平均値を結合 FITC 量に換算  
した。さらに得られた値を各 FITC 標識抗体の F/P 値  
20 で除して抗体結合数とした。

結果を第 3 図及び第 4 図に示す。COS-7 及び HCT-15  
共に nmMHCA 安定発現株において mock 細胞株に比べて G  
AH 反応性が増加していることが示された。

この結果より、nmMHCA を導入することにより、  
25 移植腫瘍細胞の表面に対する GAH の反応性が上昇  
することが示された。

実施例 3 抗 nmMHCA ペプチド抗体による細胞表面反  
応性の確認

nmMHCAのペプチド部分配列である配列表の配列番号20、21及び22のペプチドを合成し、Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH) に結合させてウサギに免疫し、各ペプチドに対するポリクローナル抗体を作成した。抗体は各ペプチドをCNBrセファロース（アマシャムバイオサイエンス社）に固定化したアフィニティカラムを用いて精製した。精製した各ポリクローナル抗体及びコントロール用のノーマルウサギ免疫グロブリン（ノーマルウサギIgG：バイオジェネシス社）をFITCで標識し、各抗体を50  $\mu$ g/mlに調製し、MKN45の培養細胞及びMKN45の皮下移植により形成した腫瘍細胞に4℃1時間反応させた。PBSで1回洗浄した後、PIを含むPBS中でフローサイトメータ（LSR：ベクトンディッキンソン社）を用いて解析した。PI陽性細胞すなわち死細胞はゲーティング操作により解析の対象から除外した。FITC蛍光強度を表す指標であるFL1の平均チャンネル数（mean値）を求めて各抗体間で比較した。

結果を第5図に示す。A、B及びCは各抗nmMHCAペプチド抗体を示し、Igはコントロール用のノーマルウサギ免疫グロブリンを示す。縦軸は、平均チャンネル数（mean値）から細胞のみの場合のバックグラウンド値（BG）を差し引いた値を示す。図中の凡例の「培養」はMKN45培養細胞、「移植」はMKN45の皮下移植により形成した腫瘍細胞を示す。

それぞれの抗体でMKN45培養細胞に対してMKN45の皮下移植により形成した腫瘍細胞でどの程度反応が上昇しているか、コントロール用のノーマルウサギ免疫グロブリンの反応をバックグラウンド値として差し引いて計算したとこ

ろ、抗体 A 及び抗体 B で 3 倍以上、また、抗体 C では 10 倍以上の上昇が認められた。

この結果より、nmMHCAペプチドのうち、配列表の配列番号 20、21 及び 22 で示した部分配列は、細胞表面に局在していることが明らかとなった。さらに、MKN45 の皮下移植により形成した腫瘍細胞では、MKN45 培養細胞に比べて、配列表の配列番号 20、21 及び 22 で示した部分配列の存在量が増加していることが明らかとなった。

10

#### 実施例 4 抗原量と抗腫瘍活性の確認

##### 癌細胞培養株

ヒト大腸癌細胞株 Caco-2、DLD-1 及び SW620 は American Type Culture Collection より入手した。ヒト大腸癌細胞株 WiDr-Tc 及びヒト食道癌細胞株 TE-8 は東北大学加齢研究所医用細胞資源センターより入手した。ヒト胃癌細胞株 HSC-3、MKN-1、MKN-45 及びヒト結腸癌細胞株 SW837 は免疫生物研究所から入手した。B37 細胞株はヒト胃癌より、公知の方法により樹立した。

15

20

##### 癌細胞表面の抗原量測定

各種癌細胞株を実施例 1 の記載の方法に従って、皮下腫瘍移植由来癌細胞を調整した。F(ab')<sub>2</sub> 化 GAH 抗体 FITC で標識し、F(ab')<sub>2</sub> 化 GAH 抗体の濃度を 50 µg/ml とし氷上で 1 時間反応すること以外は実施例 1 の方法に従って、各種癌細胞に対する反応量をフローサイトメトリーで検出した。さらに、蛍光検出量を癌細胞あたりの抗体反応量（抗原量）として表わす為に、FITC 含量の分かっている蛍光ラテックス (Flow Cytometry Standard) を標準として用い定量化した。

25

##### イムノリポソーム及びリポソームの作製

F(ab')<sub>2</sub> 化 GAH 抗体を用い、E P 公開第 1 1 7 4 1 2 6 号公報の方法に従って抗体結合リポソーム(イムノリポソーム)を作製した。すなわちジパルミトイルフォスファチジルコリン/コレステロール/ $\epsilon$ -マレイミドカプロイルジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン(18/10/0.5 モル比)からなる脂質混合物、分子量 5 0 0 0 のポリエチレングリコールを 2 本有する同公報記載のポリエチレングリコール誘導体(PEG)及び F(ab')<sub>2</sub> 化 GAH 抗体を用いドキシソルピシン(DXR)封入イムノリポソームを形成した。得られたイムノリポソームは粒径が 1 2 5 nm から 1 6 0 nm であり、F(ab')<sub>2</sub> 化 GAH 抗体/PEG/DXR/脂質の量比は 0.2:0.8:1:10 (重量比)であった。

#### 抗原量と *in vivo* 抗腫瘍活性の相関

各種癌細胞をヌードマウス皮下に移植し、腫瘍塊を形成した。腫瘍塊を数 mm<sup>3</sup> に細切し、別途用意したヌードマウスの腎臓の皮膜下に移植(Bennett et al., 1985 *Cancer Res* 45: 4963-4969)した。翌日より DXR、イムノリポソームを(DXR 換算量として 3 mg/kg)尾静脈より 1 週間おきに 3 回投与した。22 日目に解剖し、摘出腫瘍の重量を測定した。陰性対照には生理食塩水投与群を用いた。効果の指標として腫瘍増殖抑制率を以下の式によって算出した。

腫瘍増殖抑制率(%) =

(1 - 薬剤処置群の平均腫瘍重量/陰性対照群の平均腫瘍重量) x 100

結果を第 6 図に示す。縦軸は腫瘍増殖抑制率(%)を横軸は癌細胞あたりの抗原量を示す。図中、各数字は下記癌細胞株を表わす。1, Caco-2; 2, DLD-1; 3, HSC-3; 4, SW620; 5, SW837; 6, MKN-1; 7, B-37; 8, MKN-45; 9, TE-8; 10, WiDr-Tc.

その結果、癌細胞あたりの抗原量が 10<sup>5</sup>/細胞程度まで

の癌細胞に対しては、抗原量が増加するにしたがい、腫瘍増殖抑制率が向上し、それ以上の抗原量を示す癌細胞に対しては、抗腫瘍効果はほぼプラトーに達していることが示された。

## 5 実施例 5 $F(ab')_2$ 化 GAH 抗体の結合活性試験

### MKN45 固定化プレートの調製

培養液の入ったフラスコに MKN45 細胞株を接種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養を行う。フラスコのプレート面が細胞で満たされた状態となったら、培養液を取り除き、トリプシン溶液（トリプシン 1:250（ディフコ社）2.5g 及び Na<sub>2</sub>EDTA（シグマ社）0.2g を PBS で溶かし、1000mL とする）を添加して細胞を剥離させ、遠心管にとる。遠心後、上清を除き、新鮮な培養液に懸濁する。細胞数を計測し、約  $4 \times 10^5$  個/mL となるように培養液に懸濁し、96 ウェルプレートの各ウェルに 100  $\mu$ L ずつ加え、2 日間培養する。ウェルの培養液を除き、PBS を各ウェルに 200  $\mu$ L ずつ加えて、液を除く。次に、パラホルムアルデヒド溶液を各ウェルに 150  $\mu$ L ずつ加えて、室温で 1 時間静置後、ウェルのパラホルムアルデヒド溶液を除く。PBS を各ウェルに少しずつ加えて、液を除く操作を 5 回行う。BSA 溶液（シグマ社）を各ウェルに 200  $\mu$ L ずつ加え、4°C で保存する。

### 標準溶液及び試料溶液の調製

$F(ab')_2$  化 GAH 抗体を  $1 \times 10^6$  単位/mL 含む標準原液に、ウシ血清アルブミン（シグマ社）1 g を PBS で希釈した希釈液を加えて、標準溶液 1 から 6 を調製する。また、試験溶液のタンパク質含量に従い、上述の希釈液を用いて標準溶液と同等のタンパク質濃度の試料溶液 1 から 6 を調製する。

標準溶液	濃度 (単位/mL)	試料溶液	濃度 (ng/mL)
標準溶液 1	1000	試料溶液 1	1000
標準溶液 2	500	試料溶液 2	500
標準溶液 3	250	試料溶液 3	250
標準溶液 4	125	試料溶液 4	125
標準溶液 5	62.5	試料溶液 5	62.5
標準溶液 6	31.25	試料溶液 6	31.25

### 操作方法

5 プレートのウェルの液を除き、PBS 200  $\mu$ L を各ウェルに加え、液を除く操作を 5 回行う。標準溶液及び試料溶液を 1 ウェルあたり 50  $\mu$ L ずつ添加し、37°C で 2 時間静置後、液を除く。PBS 200  $\mu$ L を各ウェルに加え、液を除く操作を 5 回行う。

10 次に西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト  $\kappa$  鎖抗体溶液（カペル社）50  $\mu$ L を、各ウェルに加えて 37°C で 1 時間静置する。液を除き、洗浄液 200  $\mu$ L を各ウェルに加えて、37°C で 5 から 10 分間静置後、液を除く。更に、洗浄液 200  $\mu$ L を各ウェルに加えて液を除く操作を 5 回繰り返す。

0-フェニレンジアミン溶液（シグマ社）100  $\mu$ L を、各ウェルに加え、遮光して室温で 1 から 2 分間静置する。停止液 100  $\mu$ L を各ウェルに加え、穏やかに振り混ぜる。

15 マイクロプレートリーダーを用いて波長 490nm 及び 650nm における各ウェルの吸光度 A1 及び A2 を測定し、(A1-A2) を求める。

20 横軸に標準溶液の濃度、縦軸にその吸光度 (A1-A2) をとり、検量線を求める。各試料溶液の吸光度から、各試料溶液 1 mL 当たりの力価（単位/mL）を求め、本品 1mg 当たりの力価（単位/mg）を算出する。

その結果、結合活性の力価が 0.8 から  $1.2 \times 10^6$  単位/mg の F(ab')<sub>2</sub> 化 GAH 抗体を用いること

が有用であることが明らかになった。

#### 産業上の利用可能性

5 本発明によれば、固形腫瘍において細胞表面に露出する部分を含む抗原の提供が可能である。

10 なお、本出願は、日本特許出願 特願 2002-291953 号を優先権主張して出願されたものであり、その全体が引用により援用される。

## 請求の範囲

1. 細胞の腫瘍塊形成時に該細胞表面に露出する部分を含む抗原。

5

2. 腫瘍塊が、培養癌細胞の皮下移植により形成した固形腫瘍である請求項 1 に記載の抗原。

10

3. 固形腫瘍において、該固形腫瘍の培養細胞と比較してその存在量が増加している請求項 1 又は 2 に記載の抗原。

4. 固形腫瘍において、該固形腫瘍の培養細胞と比較して、その細胞表面の存在量が増加している請求項 1 から 3 のいずれかに記載の抗原。

15

5. 細胞骨格タンパク質又はその変異体である請求項 1 から 4 のいずれかに記載の抗原。

20

6. ミオシン又はその変異体である請求項 1 から 5 のいずれかに記載の抗原。

7. 非筋肉型ミオシン重鎖タイプ A 又はその変異体である請求項 1 から 6 のいずれかに記載の抗原。

25

8. 非筋肉型ミオシン重鎖タイプ A 又はその変異体の一部である請求項 1 から 7 のいずれかに記載の抗原。

9. 非筋肉型ミオシン重鎖タイプ A 又はその変異体のタンパク質配列の C 末端側配列である請求項 1 から 8 のいずれかに



記載の抗原。

- 5 10. タンパク質配列のC末端側配列が配列表の配列番号17のN末端側から、600残基以降1960残基までの配列である請求項9に記載の抗原。
11. タンパク質配列のC末端側配列が配列表の配列番号20、21又は22のいずれかである請求項9に記載の抗原。
- 10 12. 請求項1から11のいずれかに記載の抗原を認識するリガンド。
13. 抗体である請求項12に記載のリガンド。
- 15 14. モノクローナル抗体である請求項12又は13に記載のリガンド。
15. モノクローナル抗体が、ヒトモノクローナル抗体である請求項12から14のいずれかに記載のリガンド。
- 20 16. 癌反応性のモノクローナル抗体である請求項12から15のいずれかに記載のリガンド。
17. 癌が、胃癌、乳癌、大腸癌又は食道癌である請求項1
- 25 6に記載のリガンド。
18. 重鎖の超可変領域に、配列表の配列番号1、2及び3のアミノ酸配列を含み、軽鎖の超可変領域に、配列表の配列番号4、5及び6のアミノ酸配列を含む請求項12から請求

項 17 のいずれかに記載のリガンド。

- 5 19. 配列表の配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列表の配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む請求項12から請求項18に記載のリガンド。

20. 請求項12から19のいずれかに記載のリガンドを含有する医薬組成物。

- 10 21. ターゲティング療法剤である請求項20に記載の医薬組成物。

22. 癌組織又は癌細胞をターゲットとする請求項20又は21のいずれかに記載の医薬組成物。

15

23. 抗癌剤、抗腫瘍性タンパク質、酵素、遺伝子又は治療用アイソトープを含有する請求項20から22のいずれかに記載の医薬組成物。

20

24. 抗癌剤である請求項20から23のいずれかに記載の医薬組成物。

25. 癌が、胃癌、乳癌、大腸癌又は食道癌である請求項20から24のいずれかに記載の医薬組成物。

25

26. リポソームを含有する請求項20から25のいずれかに記載の医薬組成物。

27. 請求項12から19のいずれかに記載のリガン

ドを含有する標識剤。

28. 癌組織又は癌細胞を特異的に標識する請求項27に記載の標識剤。

5

29. 癌が、胃癌、乳癌、大腸癌又は食道癌である請求項27又は28に記載の標識剤。

10

30. 蛍光剤、酵素、アイソトープ又はMRI造影剤を含有する請求項27から29のいずれかに記載の標識剤。

15

31. 請求項1から11のいずれかに記載の抗原を発現している癌疾患患者に、当該疾患の治療の為に請求項20から26のいずれかに記載の医薬組成物を投与方法。

20

32. 請求項27から30のいずれかに記載の標識剤により標識される細胞を有する癌疾患患者に、当該疾患の治療の為に請求項20から26のいずれかに記載の医薬組成物を投与方法。

25

33. 請求項1から11のいずれかに記載の抗原を認識するリガンドの当該抗原への結合活性が、 $0.5 \times 10^6$  単位/mg から  $2.0 \times 10^6$  単位/mg である請求項12から19のいずれかに記載のリガンド。

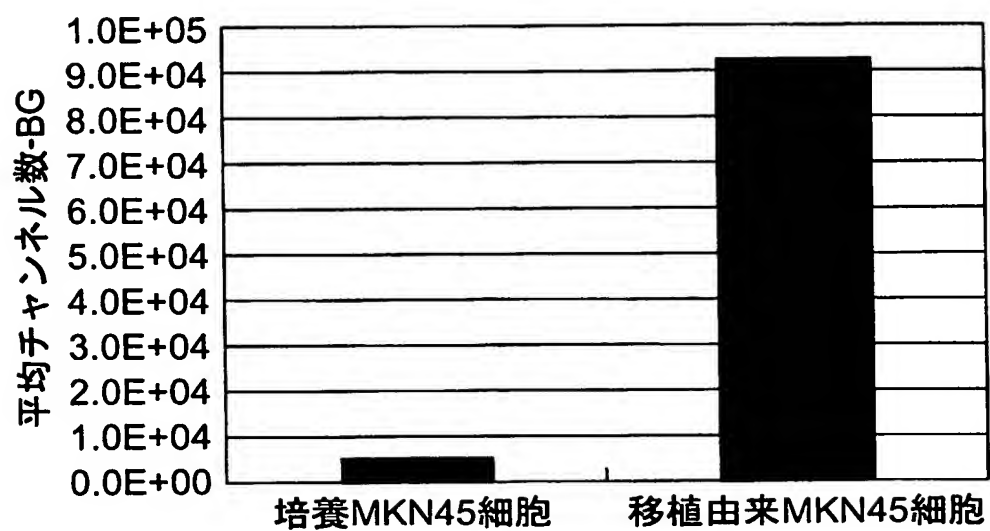
34. 結合活性が、 $0.7 \times 10^6$  単位/mg から  $1.5 \times 10^6$  単位/mg、 $0.7 \times 10^6$  単位/mg から  $1.3 \times 10^6$  単位/mg 又は  $0.8 \times 10^6$  単位/mg から  $1.2 \times 10^6$  単位/mg

0<sup>6</sup> 単位 / m g である請求項 12 から 19 のいずれかに記載のリガンド。

35. 結合活性が、0.8 × 10<sup>6</sup> 単位 / m g から 1.2 × 10<sup>6</sup> 単位 / m g である請求項 12 から 19 のいずれかに記載のリガンド。
- 5

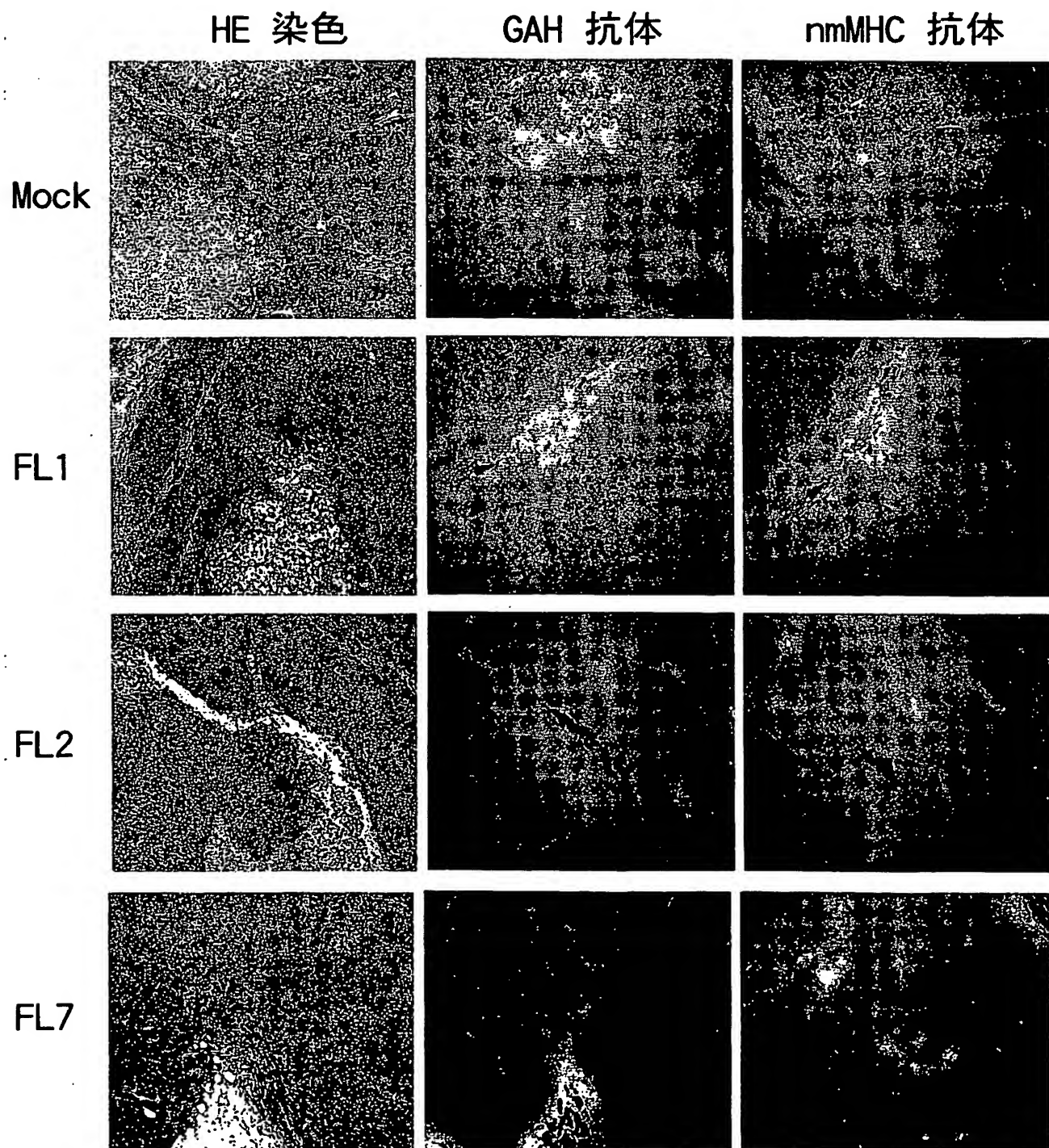
1/6

## 第1図

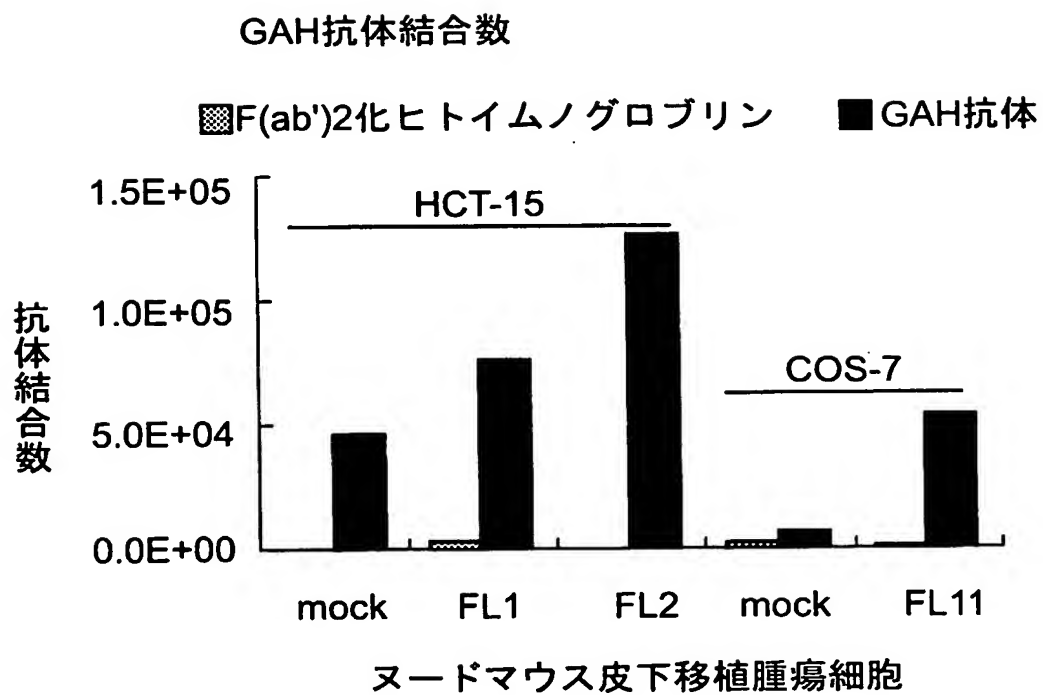


2/6

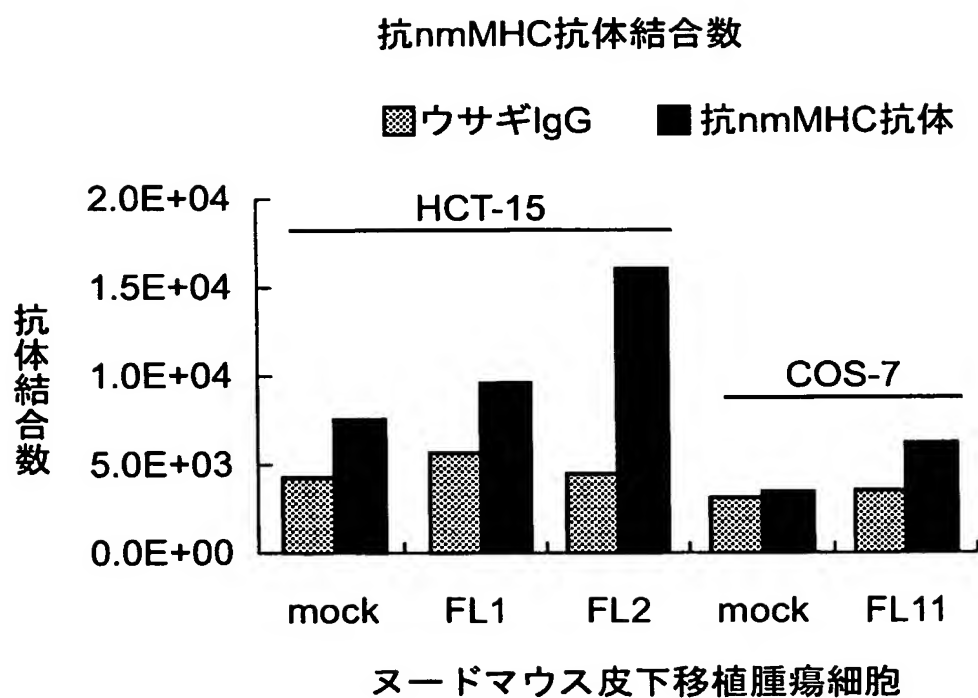
## 第 2 図



## 第3図

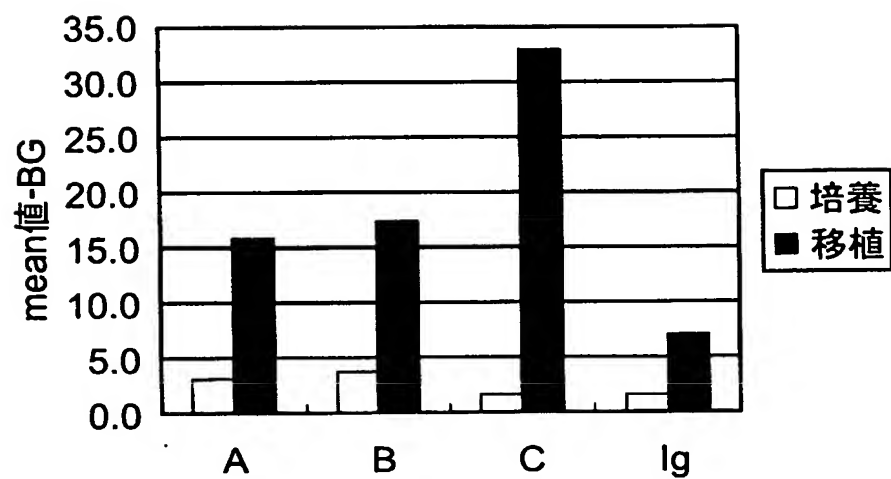


## 第4図

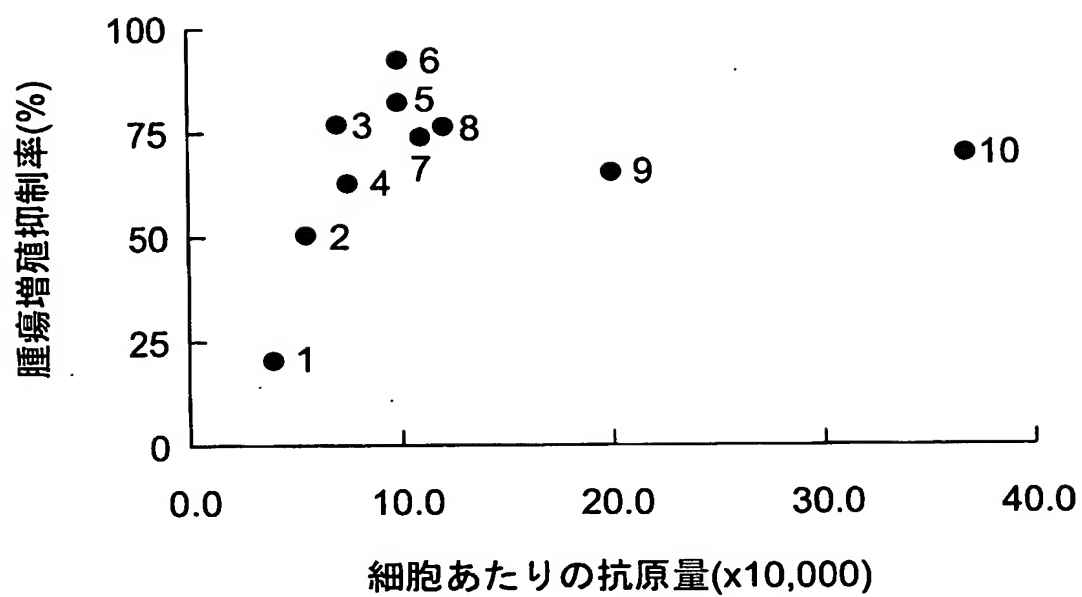




第5図



第6図



## SEQUENCE LISTING

<110> MITSUBISHI PHARMA CORPORATION

<120> Antibody recognition antigen

<130> 03038W00

<150> JP 2002-291953

<151> 2002-10-04

<160> 22

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Inventor:Hirakawa, Youko; Niki, Hisae; Oike Shinsuke

Inventor:Tagawa, Toshiaki; Hosokawa, Saiko; Yoshiyama, Yoshiko

<400> 1

Ile Ser Ser Cys Gly Phe Tyr Trp Asn

1

5

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr

1

5

10

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Thr Arg Leu Arg Gly Ala Asp Tyr

1

5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asn Ser Asn Asn Lys Lys Tyr Leu

1

5

10

15

Ala

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1

5

<210> 6

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6  
Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr  
1 5

<210> 7  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 7  
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15  
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Cys  
20 25 30  
Gly Phe Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45  
Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60  
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe  
65 70 75 80  
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95  
Cys Ala Arg Ser Thr Arg Leu Arg Gly Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110  
Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 8  
<211> 114  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 8  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15  
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asn  
20 25 30  
Ser Asn Asn Lys Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45  
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60  
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80  
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
85 90 95  
Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
100 105 110  
Lys Arg

<210> 9  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 9  
Leu Val Trp Val Pro Ser Asp Lys  
1 5

<210> 10  
<211> 16  
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Val Ser His Leu Leu Gly Ile Asn Val Thr Asp Phe Thr Arg Gly Ile  
1 5 10 15

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Glu Gln Ala Asp Phe Ala Ile Glu Ala Leu Ala Lys  
1 5 10

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 12

Asp Val Asp Arg Ile Ile Gly Leu Asp Gln Val Ala Gly Met Ser Glu  
1 5 10 15

Thr

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 13

Thr Glu Leu Glu Asp Thr Leu Asp Ser Thr Ala Ala Gln Gln Glu  
1 5 10 15

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 14

Ala Leu Glu Ser Gln Leu Gln Asp Thr Gln Glu Leu  
1 5 10

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 15

Ser Met Glu Ala Glu Met Ile Gln Leu Gln Glu Glu Leu Ala Ala Ala  
1 5 10 15

<210> 16  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Homo Sapiens

<400> 16

Arg Arg Leu Glu Ala Arg Ile Ala Gln Leu Glu Glu Glu Leu Glu Glu  
1 5 10 15

Glu

<210> 17  
<211> 1960  
<212> PRT  
<213> Homo Sapiens

<400> 17

Met Ala Gln Gln Ala Ala Asp Lys Tyr Leu Tyr Val Asp Lys Asn Phe  
1 5 10 15

Ile Asn Asn Pro Leu Ala Gln Ala Asp Trp Ala Ala Lys Lys Leu Val  
20 25 30

Trp Val Pro Ser Asp Lys Ser Gly Phe Glu Pro Ala Ser Leu Lys Glu  
35 40 45

Glu Val Gly Glu Glu Ala Ile Val Glu Leu Val Glu Asn Gly Lys Lys  
50 55 60

Val Lys Val Asn Lys Asp Asp Ile Gln Lys Met Asn Pro Pro Lys Phe  
65 70 75 80

Ser Lys Val Glu Asp Met Ala Glu Leu Thr Cys Leu Asn Glu Ala Ser  
85 90 95

Val Leu His Asn Leu Lys Glu Arg Tyr Tyr Ser Gly Leu Ile Tyr Thr  
100 105 110

Tyr Ser Gly Leu Phe Cys Val Val Ile Asn Pro Tyr Lys Asn Leu Pro  
115 120 125

Ile Tyr Ser Glu Glu Ile Val Glu Met Tyr Lys Gly Lys Lys Arg His  
130 135 140

Glu Met Pro Pro His Ile Tyr Ala Ile Thr Asp Thr Ala Tyr Arg Ser  
145 150 155 160

Met Met Gln Asp Arg Glu Asp Gln Ser Ile Leu Cys Thr Gly Glu Ser  
165 170 175

Gly Ala Gly Lys Thr Glu Asn Thr Lys Lys Val Ile Gln Tyr Leu Ala

180 185 190

Tyr Val Ala Ser Ser His Lys Ser Lys Lys Asp Gln Gly Glu Leu Glu  
195 200 205

Arg Gln Leu Leu Gln Ala Asn Pro Ile Leu Glu Ala Phe Gly Asn Ala  
210 215 220

Lys Thr Val Lys Asn Asp Asn Ser Ser Arg Phe Gly Lys Phe Ile Arg  
225 230 235 240

Ile Asn Phe Asp Val Asn Gly Tyr Ile Val Gly Ala Asn Ile Glu Thr  
245 250 255

Tyr Leu Leu Glu Lys Ser Arg Ala Ile Arg Gln Ala Lys Glu Glu Arg  
260 265 270

Thr Phe His Ile Phe Tyr Tyr Leu Leu Ser Gly Ala Gly Glu His Leu  
275 280 285

Lys Thr Asp Leu Leu Leu Glu Pro Tyr Asn Lys Tyr Arg Phe Leu Ser  
290 295 300

Asn Gly His Val Thr Ile Pro Gly Gln Gln Asp Lys Asp Met Phe Gln  
305 310 315 320

Glu Thr Met Glu Ala Met Arg Ile Met Gly Ile Pro Glu Glu Glu Gln  
325 330 335

Met Gly Leu Leu Arg Val Ile Ser Gly Val Leu Gln Leu Gly Asn Ile  
340 345 350

Val Phe Lys Lys Glu Arg Asn Thr Asp Gln Ala Ser Met Pro Asp Asn  
355 360 365

Thr Ala Ala Gln Lys Val Ser His Leu Leu Gly Ile Asn Val Thr Asp  
370 375 380

Phe Thr Arg Gly Ile Leu Thr Pro Arg Ile Lys Val Gly Arg Asp Tyr  
385 390 395 400

Val Gln Lys Ala Gln Thr Lys Glu Gln Ala Asp Phe Ala Ile Glu Ala  
405 410 415

Leu Ala Lys Ala Thr Tyr Glu Arg Met Phe Arg Trp Leu Val Leu Arg  
420 425 430

Ile Asn Lys Ala Leu Asp Lys Thr Lys Arg Gln Gly Ala Ser Phe Ile  
435 440 445

Gly Ile Leu Asp Ile Ala Gly Phe Glu Ile Phe Asp Leu Asn Ser Phe  
450 455 460

Glu Gln Leu Cys Ile Asn Tyr Thr Asn Glu Lys Leu Gln Gln Leu Phe  
465 470 475 480

Asn His Thr Met Phe Ile Leu Glu Gln Glu Glu Tyr Gln Arg Glu Gly  
485 490 495

Ile Glu Trp Asn Phe Ile Asp Phe Gly Leu Asp Leu Gln Pro Cys Ile  
500 505 510

Asp Leu Ile Glu Lys Pro Ala Gly Pro Pro Gly Ile Leu Ala Leu Leu  
515 520 525

Asp Glu Glu Cys Trp Phe Pro Lys Ala Thr Asp Lys Ser Phe Val Glu  
530 535 540

Lys Val Met Gln Glu Gln Gly Thr His Pro Lys Phe Gln Lys Pro Lys  
545 550 555 560

Gln Leu Lys Asp Lys Ala Asp Phe Cys Ile Ile His Tyr Ala Gly Lys  
565 570 575

Val Asp Tyr Lys Ala Asp Glu Trp Leu Met Lys Asn Met Asp Pro Leu  
580 585 590

Asn Asp Asn Ile Ala Thr Leu Leu His Gln Ser Ser Asp Lys Phe Val  
595 600 605

Ser Glu Leu Trp Lys Asp Val Asp Arg Ile Ile Gly Leu Asp Gln Val  
610 615 620

Ala Gly Met Ser Glu Thr Ala Leu Pro Gly Ala Phe Lys Thr Arg Lys  
625 630 635 640

Gly Met Phe Arg Thr Val Gly Gln Leu Tyr Lys Glu Gln Leu Ala Lys  
645 650 655

Leu Met Ala Thr Leu Arg Asn Thr Asn Pro Asn Phe Val Arg Cys Ile  
660 665 670

Ile Pro Asn His Glu Lys Lys Ala Gly Lys Leu Asp Pro His Leu Val  
675 680 685

Leu Asp Gln Leu Arg Cys Asn Gly Val Leu Glu Gly Ile Arg Ile Cys  
690 695 700

Arg Gln Gly Phe Pro Asn Arg Val Val Phe Gln Glu Phe Arg Gln Arg  
705 710 715 720



Tyr Glu Ile Leu Thr Pro Asn Ser Ile Pro Lys Gly Phe Met Asp Gly  
725 730 735

Lys Gln Ala Cys Val Leu Met Ile Lys Ala Leu Glu Leu Asp Ser Asn  
740 745 750

Leu Tyr Arg Ile Gly Gln Ser Lys Val Phe Phe Arg Ala Gly Val Leu  
755 760 765

Ala His Leu Glu Glu Glu Arg Asp Leu Lys Ile Thr Asp Val Ile Ile  
770 775 780

Gly Phe Gln Ala Cys Cys Arg Gly Tyr Leu Ala Arg Lys Ala Phe Ala  
785 790 795 800

Lys Arg Gln Gln Gln Leu Thr Ala Met Lys Val Leu Gln Arg Asn Cys  
805 810 815

Ala Ala Tyr Leu Lys Leu Arg Asn Trp Gln Trp Trp Arg Leu Phe Thr  
820 825 830

Lys Val Lys Pro Leu Leu Gln Val Ser Arg Gln Glu Glu Glu Met Met  
835 840 845

Ala Lys Glu Glu Glu Leu Val Lys Val Arg Glu Lys Gln Leu Ala Ala  
850 855 860

Glu Asn Arg Leu Thr Glu Met Glu Thr Leu Gln Ser Gln Leu Met Ala  
865 870 875 880

Glu Lys Leu Gln Leu Gln Glu Gln Leu Gln Ala Glu Thr Glu Leu Cys  
885 890 895

Ala Glu Ala Glu Glu Leu Arg Ala Arg Leu Thr Ala Lys Lys Gln Glu  
900 905 910

Leu Glu Glu Ile Cys His Asp Leu Glu Ala Arg Val Glu Glu Glu Glu  
915 920 925

Glu Arg Cys Gln His Leu Gln Ala Glu Lys Lys Lys Met Gln Gln Asn  
930 935 940

Ile Gln Glu Leu Glu Glu Gln Leu Glu Glu Glu Glu Ser Ala Arg Gln  
945 950 955 960

Lys Leu Gln Leu Glu Lys Val Thr Thr Glu Ala Lys Leu Lys Lys Leu  
965 970 975

Glu Glu Glu Gln Ile Ile Leu Glu Asp Gln Asn Cys Lys Leu Ala Lys  
980 985 990

Glu Lys Lys Leu Leu Glu Asp Arg Ile Ala Glu Phe Thr Thr Asn Leu  
995 1000 1005

Thr Glu Glu Glu Glu Lys Ser Lys Ser Leu Ala Lys Leu Lys Asn  
1010 1015 1020

Lys His Glu Ala Met Ile Thr Asp Leu Glu Glu Arg Leu Arg Arg  
1025 1030 1035

Glu Glu Lys Gln Arg Gln Glu Leu Glu Lys Thr Arg Arg Lys Leu  
1040 1045 1050

Glu Gly Asp Ser Thr Asp Leu Ser Asp Gln Ile Ala Glu Leu Gln  
1055 1060 1065

Ala Gln Ile Ala Glu Leu Lys Met Gln Leu Ala Lys Lys Glu Glu  
1070 1075 1080

Glu Leu Gln Ala Ala Leu Ala Arg Val Glu Glu Glu Ala Ala Gln  
1085 1090 1095

Lys Asn Met Ala Leu Lys Lys Ile Arg Glu Leu Glu Ser Gln Ile  
1100 1105 1110

Ser Glu Leu Gln Glu Asp Leu Glu Ser Glu Arg Ala Ser Arg Asn  
1115 1120 1125

Lys Ala Glu Lys Gln Lys Arg Asp Leu Gly Glu Glu Leu Glu Ala  
1130 1135 1140

Leu Lys Thr Glu Leu Glu Asp Thr Leu Asp Ser Thr Ala Ala Gln  
1145 1150 1155

Gln Glu Leu Arg Ser Lys Arg Glu Gln Glu Val Asn Ile Leu Lys  
1160 1165 1170

Lys Thr Leu Glu Glu Glu Ala Lys Thr His Glu Ala Gln Ile Gln  
1175 1180 1185

Glu Met Arg Gln Lys His Ser Gln Ala Val Glu Glu Leu Ala Glu  
1190 1195 1200

Gln Leu Glu Gln Thr Lys Arg Val Lys Ala Asn Leu Glu Lys Ala  
1205 1210 1215

Lys Gln Thr Leu Glu Asn Glu Arg Gly Glu Leu Ala Asn Glu Val  
1220 1225 1230

Lys Val Leu Leu Gln Gly Lys Gly Asp Ser Glu His Lys Arg Lys

1235	1240	1245
Lys Val Glu Ala Gln Leu Gln 1250 1255	Glu Leu Gln Val	Lys Phe Asn Glu 1260
Gly Glu Arg Val Arg Thr Glu 1265 1270	Leu Ala Asp Lys	Val Thr Lys Leu 1275
Gln Val Glu Leu Asp Asn Val 1280 1285	Thr Gly Leu Leu	Ser Gln Ser Asp 1290
Ser Lys Ser Ser Lys Leu Thr 1295 1300	Lys Asp Phe Ser	Ala Leu Glu Ser 1305
Gln Leu Gln Asp Thr Gln Glu 1310 1315	Leu Leu Gln Glu	Glu Asn Arg Gln 1320
Lys Leu Ser Leu Ser Thr Lys 1325 1330	Leu Lys Gln Val	Glu Asp Glu Lys 1335
Asn Ser Phe Arg Glu Gln Leu 1340 1345	Glu Glu Glu Glu	Glu Ala Lys His 1350
Asn Leu Glu Lys Gln Ile Ala 1355 1360	Thr Leu His Ala	Gln Val Ala Asp 1365
Met Lys Lys Lys Met Glu Asp 1370 1375	Ser Val Gly Cys	Leu Glu Thr Ala 1380
Glu Glu Val Lys Arg Lys Leu 1385 1390	Gln Lys Asp Leu	Glu Gly Leu Ser 1395
Gln Arg His Glu Glu Lys Val 1400 1405	Ala Ala Tyr Asp	Lys Leu Glu Lys 1410
Thr Lys Thr Arg Leu Gln Gln 1415 1420	Glu Leu Asp Asp	Leu Leu Val Asp 1425
Leu Asp His Gln Arg Gln Ser 1430 1435	Ala Cys Asn Leu	Glu Lys Lys Gln 1440
Lys Lys Phe Asp Gln Leu Leu 1445 1450	Ala Glu Glu Lys	Thr Ile Ser Ala 1455
Lys Tyr Ala Glu Glu Arg Asp 1460 1465	Arg Ala Glu Ala	Glu Ala Arg Glu 1470
Lys Glu Thr Lys Ala Leu Ser 1475 1480	Leu Ala Arg Ala	Leu Glu Glu Ala 1485

Met Glu Gln Lys Ala Glu Leu Glu Arg Leu Asn Lys Gln Phe Arg  
1490 1495 1500

Thr Glu Met Glu Asp Leu Met Ser Ser Lys Asp Asp Val Gly Lys  
1505 1510 1515

Ser Val His Glu Leu Glu Lys Ser Lys Arg Ala Leu Glu Gln Gln  
1520 1525 1530

Val Glu Glu Met Lys Thr Gln Leu Glu Glu Leu Glu Asp Glu Leu  
1535 1540 1545

Gln Ala Thr Glu Asp Ala Lys Leu Arg Leu Glu Val Asn Leu Gln  
1550 1555 1560

Ala Met Lys Ala Gln Phe Glu Arg Asp Leu Gln Gly Arg Asp Glu  
1565 1570 1575

Gln Ser Glu Glu Lys Lys Lys Gln Leu Val Arg Gln Val Arg Glu  
1580 1585 1590

Met Glu Ala Glu Leu Glu Asp Glu Arg Lys Gln Arg Ser Met Ala  
1595 1600 1605

Val Ala Ala Arg Lys Lys Leu Glu Met Asp Leu Lys Asp Leu Glu  
1610 1615 1620

Ala His Ile Asp Ser Ala Asn Lys Asn Arg Asp Glu Ala Ile Lys  
1625 1630 1635

Gln Leu Arg Lys Leu Gln Ala Gln Met Lys Asp Cys Met Arg Glu  
1640 1645 1650

Leu Asp Asp Thr Arg Ala Ser Arg Glu Glu Ile Leu Ala Gln Ala  
1655 1660 1665

Lys Glu Asn Glu Lys Lys Leu Lys Ser Met Glu Ala Glu Met Ile  
1670 1675 1680

Gln Leu Gln Glu Glu Leu Ala Ala Ala Glu Arg Ala Lys Arg Gln  
1685 1690 1695

Ala Gln Gln Glu Arg Asp Glu Leu Ala Asp Glu Ile Ala Asn Ser  
1700 1705 1710

Ser Gly Lys Gly Ala Leu Ala Leu Glu Glu Lys Arg Arg Leu Glu  
1715 1720 1725

Ala Arg Ile Ala Gln Leu Glu Glu Glu Leu Glu Glu Gln Gly  
1730 1735 1740

Asn Thr Glu Leu Ile Asn Asp Arg Leu Lys Lys Ala Asn Leu Gln  
1745 1750 1755

Ile Asp Gln Ile Asn Thr Asp Leu Asn Leu Glu Arg Ser His Ala  
1760 1765 1770

Gln Lys Asn Glu Asn Ala Arg Gln Gln Leu Glu Arg Gln Asn Lys  
1775 1780 1785

Glu Leu Lys Val Lys Leu Gln Glu Met Glu Gly Thr Val Lys Ser  
1790 1795 1800

Lys Tyr Lys Ala Ser Ile Thr Ala Leu Glu Ala Lys Ile Ala Gln  
1805 1810 1815

Leu Glu Glu Gln Leu Asp Asn Glu Thr Lys Glu Arg Gln Ala Ala  
1820 1825 1830

Cys Lys Gln Val Arg Arg Thr Glu Lys Lys Leu Lys Asp Val Leu  
1835 1840 1845

Leu Gln Val Asp Asp Glu Arg Arg Asn Ala Glu Gln Tyr Lys Asp  
1850 1855 1860

Gln Ala Asp Lys Ala Ser Thr Arg Leu Lys Gln Leu Lys Arg Gln  
1865 1870 1875

Leu Glu Glu Ala Glu Glu Glu Ala Gln Arg Ala Asn Ala Ser Arg  
1880 1885 1890

Arg Lys Leu Gln Arg Glu Leu Glu Asp Ala Thr Glu Thr Ala Asp  
1895 1900 1905

Ala Met Asn Arg Glu Val Ser Ser Leu Lys Asn Lys Leu Arg Arg  
1910 1915 1920

Gly Asp Leu Pro Phe Val Val Pro Arg Arg Met Ala Arg Lys Gly  
1925 1930 1935

Ala Gly Asp Gly Ser Asp Glu Glu Val Asp Gly Lys Ala Asp Gly  
1940 1945 1950

Ala Glu Ala Lys Pro Ala Glu  
1955 1960

<210> 18  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 18

cgggtaccat ggcacagcaa gctgcc

26

<210> 19  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 19  
gactagtctt ctcgtcctcc acctgc

26

<210> 20  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 20  
Ala Leu Pro Gly Ala Phe Lys Thr Arg Lys  
5 10

<210> 21  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 21  
Glu Glu Leu Val Lys Val Arg Glu Lys Gln  
5 10

<210> 22  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 22  
Ala Asp Gly Ala Glu Ala Lys Pro Ala Glu  
5 10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12732

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/705, C07K16/28, A61K9/127, A61K39/395, A61K51/00,  
A61P35/00, C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/705, C07K16/28, A61K9/127, A61K39/395, A61K51/00,  
A61P35/00, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JSTPlus (JOIS), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CAS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	EP 520499 A1 (Mitsubishi Kasei Corp.), 30 December, 1992 (30.12.92), & US 5767246 A & JP 5-304987 A & CA 2072249 A	12-30, 33-35 1-11
X	EP 399257 A1 (OREGON HEALTH SCI. U.), 28 November, 1990 (28.11.90), & US 5200508 A & JP 3-81299 A & CA 2015862 A	1-4, 12-16, 20, 24, 33-35
X	MODAK Shakeel et al., 'Monoclonal Antibody 8H9 Targets a Novel Cell Surface Antigen Expressed by a Wide Spectrum of Human Solid Tumor', CANCER RESEARCH 61, 4048-4054, (2001)	1, 3, 4, 12-16, 33-35

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	---

Date of the actual completion of the international search 13 November, 2003 (13.11.03)	Date of mailing of the international search report 02 December, 2003 (02.12.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12732

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92/08131 A1 (UNIV. COLUMBIA NEW YORK), 14 May, 1992 (14.05.92), & US 6159751 A & EP 641385 A1 & JP 6-505147 A	1, 3, 4, 12-17, 20-30, 33-35
X	WO 02/057741 A2 (MOLECULAR DISCOVERIES, L.L.C.), 25 July, 2002 (25.07.02), & US 2002/137109 A1 & EP 1350085 A2	1, 3, 4, 12-17, 20-30, 33-35
X	DIPPOLD Wolfgang G. et al., 'A Common Epithelial Cell Surface Antigen (EPM-1) on Gastrointestinal Tumors and in Human Sera', CANCER RESEARCH 47, 3873-3879, (1987)	1, 3, 4, 12-16, 33-35
X	OHUCHI Noriaki et al., 'Characterization of Cell Surface Antigens Expressed in the HMA-1 Breast Cancer Cell Line', Surg.Today 25, 244-250, (1995)	1, 3, 4, 12-16, 33-35
X	IMAM S.A. et al., 'Identification of a Cell- Surface Antigen (LEA.135) Associated with Favorable Prognosis in Human Breast Cancer', CANCER RESEARCH 53, 3233-3236, (1993)	1, 3, 4
A	NATALI Pier G. et al., 'Heterogeneous distribution of actin, myosin, fibronectin and basement membrane antigens in primary and metastatic human breast cancer', Virchows Archiv A: Pathological Anatomy and Histopathology, 405(1)69-83, (1984)	5-11



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12732

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 31, 32

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in claims 31, 32 involve methods for treatment of the human body by therapy and diagnostic methods and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C07K14/705、C07K16/28、A61K9/127、A61K39/395、A61K51/00、A61P35/00、C12N15/09

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C07K14/705、C07K16/28、A61K9/127、A61K39/395、A61K51/00、A61P35/00、C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
JSTPlus(JOIS)、MEDLINE (STN)、BIOSIS (STN)、CAS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	EP 520499 A1 (三菱化成株式会社) 1992, 12, 30 & US 5767246 A & JP 5-304987 A & CA 2072249 A	12-30, 33-35 1-11
X	EP 399257 A1 (OREGON HEALTH SCI U) 1990. 11. 28 & US 5200508 A & JP 3-81299 A & CA 2015862 A	1-4, 12-16, 20, 24, 33-35
X	MODAK Shakeel et al., 'Monoclonal Antibody 8H9 Targets a Novel Cell Surface Antigen Expressed by a Wide Spectrum of	1, 3, 4, 12-16, 33-35

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 11. 03

国際調査報告の発送日

02.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

植原 克典

4B

9840

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	Human Solid Tumor' CANCER RESEARCH 61, 4048-4054(2001)	
X	WO 92/08131 A1 (UNIV COLUMBIA NEW YORK) 1992. 05. 14 & US 6159751 A & EP 641385 A1 & JP 6-505147 A	1, 3, 4, 12-17, 20-30, 33-35
X	WO 02/057741 A2 (MOLECULAR DISCOVERIES, L. L. C.) 2002. 07. 25 & US 2002/137109 A1 & EP 1350085 A2	1, 3, 4, 12-17, 20-30, 33-35
X	DIPPOLD Wolfgang G. et al. 'A Common Epithelial Cell Surface Antigen(EPM-1) on Gastrointestinal Tumors and in Human Sera' CANCER RESEARCH 47, 3873-3879(1987)	1, 3, 4, 12-16, 33-35
X	OHUCHI Noriaki et al, 'Characterization of Cell Surface Antigens Expressed in the HMA-1 Breast Cancer Cell Line' Surg Today 25, 244-250(1995)	1, 3, 4, 12-16, 33-35
X	IMAM S. A. et al. 'Identification of a Cell-Surface Antigen (LEA. 135) Associated with Favorable Prognosis in Human Breast Cancer' CANCER RESEARCH 53, 3233-3236(1993)	1, 3, 4
A	NATALI Pier G. et al. 'Heterogeneous distribution of actin, myosin, fibronectin and basement membrane antigens in primary and metastatic human breast cancer' Virchows Archiv A:Pathological Anatomy and Histopathology 40 5(1)69-83(1984)	5-11

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 31, 32 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、

上記請求の範囲に記載された発明は、人の治療・診断方法を包含するものであるから、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**